昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*, January 2010, 53(1): 20 – 28 ISSN 0454-6296

甜菜夜蛾 HSP90 基因克隆及高温胁迫下其表达量的变化

翟会芳，江幸福*，罗礼智
（中国农业科学院植物保护研究所，植物病虫害生物学国家重点实验室，北京 100193）

摘要：为阐明热激蛋白 90(heat shock protein 90, HSP90)在甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (Hübner)幼虫抵抗高温过程中的作用，克隆了其 HSP90 基因 cDNA 全长序列，并检测了在系列高温胁迫下不同龄期幼虫体内其相对表达量。根据已报道的热激蛋白 90 基因序列同源性设计简并引物，利用反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)结合 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术成功克隆了甜菜夜蛾 HSP90 基因全长 cDNA(GenBank 登录号 FJ862050)。该 cDNA 序列开放阅读框长 2 154 bp，编码 717 个氨基酸，预测的相对分子量和等电点分别为 82.6 kD 和 5.0。该序列具有 HSP90 家族的典型特征和特殊的功能结构域，并且与多种生物的 HSP90 基因序列有较高的同源性。为了研究 HSP90 抵抗高温的作用，构建荧光定量 RT-PCR 体系，检测了 37，39，41，43 和 45℃胁迫下甜菜夜蛾不同龄期幼虫体内 HSP90 表达量的变化。结果表明，高温胁迫对甜菜夜蛾幼虫体内的 HSP90 表达具有明显的诱导作用。幼虫体内 HSP90 表达量随着温度升高呈增加的趋势。43℃和45℃胁迫下，各龄幼虫体内 HSP90 的表达量均显著高于常温($P < 0.05$)，但不同龄期之间没有显著差异。这说明 HSP90 在甜菜夜蛾幼虫抗高温中起到重要作用。

关键词：甜菜夜蛾；热激蛋白 90；cDNA 克隆；序列分析；实时荧光定量 RT-PCR；HSP90 表达
中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2010)01-0020-09

Cloning and expression of HSP90 cDNA in larvae of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) under high temperature stress

ZHAI Hui-Fang, JIANG Xing-Fu*, LUO Li-Zhi (State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: To clarify the effect of heat shock protein 90 (HSP90) on tolerance to high temperature in larvae of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), a full-length cDNA encoding HSP90 from *S. exigua* was cloned and characterized by RT-PCR and RACE technique. The complete cDNA (2 453 bp) contains a 2 154 bp open reading frame encoding 717 amino acid residues (GenBank accession no. FJ862050). The complete amino acid sequence of HSP90 deduced from the cDNA consists of 25 residues for the putative signal peptide and 692 residues for the mature protein with the predicted molecular weight of 82.6 kD and the isoelectric point of 5.0, respectively, and carries an important and intact HSP90 signature sequence. The nucleotide sequence of the cDNA is highly similar with the HSP90 cDNA sequences of some other insect species. In order to explore the effects of HSP90 on tolerance to high temperature, a standard system was designed for real-time fluorescence quantitative RT-PCR, with which the relative expression of HSP90 gene at different instars of larvae in response to high temperatures was detected. The results indicated that high temperature induced the HSP90 expression obviously. Relative expression levels of HSP90 gene increased with the increase of temperature. The HSP90 expression levels in larvae of all tested instars under 43℃ and 45℃ were significantly higher than that under the normal temperature. However, the HSP90 expression levels in larvae of different instars were not significantly different. The results suggest that HSP90 may play an important role in high temperature tolerance in *S. exigua*.

Key words: *Spodoptera exigua*; HSP90; cDNA cloning; sequence analysis; real-time fluorescence quantitative RT-PCR; HSP90 expression

基金项目：公益性行业(农业)科技专项(200803007)；北京市自然科学基金项目(6072023)；国家重点实验室专项(SKL2007SR09)；国家“十一五”科技支撑项目(2006BAD08A08)

作者简介：翟会芳，1982 年生，河南濮阳人，硕士，研究方向为农业昆虫与害虫综合治理，E-mail：zhaihf000@126.com
*通讯作者 Corresponding author, E-mail：xfjiang@ippcaas.cn

收稿日期 Received：2009-09-24；接受日期 Accepted：2009-12-18

甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*(Hübner)是一种世界性农业害虫，具有较强的生态可塑性，其原产于亚洲南部，是一种热带或亚热带昆虫，对高温有较强的适应能力(Gill, 1987)。在我国，甜菜夜蛾在华南地区可常年发生危害，无越冬现象(江幸福等, 2001)，危害最严重的时期均出现在当地气温较高的时候。在长江流域，甜菜夜蛾的大发生与上年和当年的气候密切相关，尤其是当年 7 – 9 月份的气温和降雨量。冬春时节长期阴雨低温，夏秋季节高温干旱且降雨量较少，有利于甜菜夜蛾暴发危害。华中和华北地区甜菜夜蛾大发生时期也分别出现在当地 7 – 9 月份的高温季节(江幸福和罗礼智, 1999)。同时，甜菜夜蛾也是一种抗寒能力较强的昆虫，其在我国发生危害的北界已达到辽宁省(许国庆和安桂荣, 2000)，长江流域和华北地区均有甜菜夜蛾以蛹或幼虫越冬的报道(周传金和徐学芹, 1993)。在土库曼，也有甜菜夜蛾在当地以蛹越冬从而成为翌年发生虫源的报道(Kurdov, 1986)。为阐明甜菜夜蛾的抗寒与耐高温特性，揭示其越冬与迁飞为害的关系，中国农业科学院植物保护研究所自上世纪 90 年代开始，对甜菜夜蛾的越冬、迁飞以及生殖三者间的关系进行了系统的研究。分别从生态学、生理学角度阐明了其抗寒、耐热机制及其生态可塑性(江幸福和罗礼智, 2001; 江幸福等, 2002)。但从分子水平上仍缺乏对其温度适应性进行深入研究。

热激蛋白(heat shock protein, HSP)是生物机体应对高温和低温以及其他不利的环境条件时，短时间内在体内能产生的一类应激性蛋白。根据其分子量的大小可分为不同的蛋白家族(Carper *et al.*, 1987; Feder and Hofmann, 1999)。其中昆虫 HSP70 和 HSP90 与温度胁迫应激性密切相关。在正常情况下，这类蛋白在昆虫体内都有存在，一旦遇到高温、低温、干旱以及重金属离子等各种胁迫因子刺激，其合成量就显著增加，从而增强抗逆境能力(Sørensen *et al.*, 2003; 王海鸿和雷仲仁, 2005)。因此，通过在转录水平上监测昆虫体内的 HSP 基因表达量的变化，可以从分子水平上揭示昆虫的抗逆境和生态适应能力，从而为阐明其发生危害规律奠定基础。目前，国内外已从多种昆虫中克隆出了 HSP90 基因序列，并对其在转录水平的表达与环境因子的刺激进行了研究(Rinehart and Denlinger, 2000; Chen *et al.*, 2005; Sonoda *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007)。甜菜夜蛾在高温干旱季节发生比较严重，并且越冬北界已经达到辽宁省，那么热激蛋白作为一种重要的抗逆蛋白是不是在甜菜夜蛾对抗高温、严寒环境的过程中表达水平有显著的升高，同时对细胞产生保护作用呢？而对甜菜夜蛾热激蛋白 HSP90 基因的克隆及序列分析迄今未见报道，限制了对其抗寒、耐热等生态可塑性机理的进一步认识。我们在克隆了甜菜夜蛾 HSP90 基因全长 cDNA 基础上，对其所推导的氨基酸序列与其他昆虫进行了比较及同源性分析，并构建了实时荧光定量 RT-PCR 体系，检测了不同发育阶段的甜菜夜蛾幼虫体内 HSP90 在不同高温胁迫下表达量的变化，以期揭示高温胁迫与 HSP90 表达量间关系，从而从分子水平阐明甜菜夜蛾耐高温机理。

1　材料与方法

1.1　虫源

实验所用甜菜夜蛾为本实验室在室内用人工饲料饲养的幼虫(江幸福等, 1999)。

1.2　主要试剂和酶类

总 RNA 提取试剂 TRIzol 购自 Invitrogen 公司。反转录 Quantscript RT Kit 购自天根生物科技有限公司。PrimeScript™ RT Reagent Kit (Perfect Real Time)、Ex-Taq DNA 聚合酶、dNTP、限制性内切酶、3′RACE 和 5′RACE Kit、DNase Ⅰ(RNase Free)、SYBR Premix EX Taq™(Perfect Real Time)等均购自大连宝生物工程有限公司。胶回收试剂盒购自加拿大新产业科技公司。感受态细胞 Top10、克隆载体 pEasy-t3 购自北京全式金生物技术有限公司。

1.3　甜菜夜蛾 HSP90 基因全长 cDNA 克隆

1.3.1　总 RNA 提取和第一链 cDNA 的合成：采集甜菜夜蛾幼虫，先在 40℃ 水浴中温热 1 h，之后在常温下恢复 1 h。用液氮研磨后采用 Trizol 法提取总 RNA，其 RNA 沉淀用 50 μL DEPC 处理的超纯水溶解。取 2 μL 总 RNA 为模板，以 Oligo$(dT)_{15}$为反转录引物，在反转录酶的作用下催化第一链 cDNA 的合成。

1.3.2　HSP90 基因片段的克隆：参考 GenBank 中已登录的甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae*(GenBank: AB251894)、粘虫 *Mythimna separate*(GenBank: EU306519)和草地螟 *Loxostege sticticalis*(GenBank: EU233821)的 HSP90 基因序列，用 Primer5.0 设计 2 对简并引物 H90F1 和 H90R1 及 H90F2 和 H90R2(表 1)。以第一链 cDNA 为模板进行扩增，反应参

数为：94℃预变性3 min；然后94℃变性30 s，53℃退火30 s，72℃延伸1 min，共30个循环；最后72℃延伸10 min。扩增的PCR产物以1.2%的琼脂糖凝胶电泳进行检测和分离，用DNA纯化回收试剂盒纯化后连接到pEASY-t3载体中，转化TOP10感受态细胞，挑选单菌落放大培养，提取质粒进行酶切鉴定，挑选阳性克隆送上海生工进行序列测定。

1.3.3 RACE扩增：根据上述已取得的HSP90序列，设计合成2条基因特异性引物GSP1和GSP2（表1），分别用于3′RACE-PCR和5′RACE-PCR扩增获得甜菜夜蛾HSP90基因的3′末端和5′末端cDNA序列。3′RACE反应按照TaKaRa 3′-Full RACE Core Set说明书进行。反应参数为：94℃预变性3 min；然后94℃变性30 s，53℃退火30 s，72℃延伸1 min，共30个循环；最后72℃延伸10 min。扩增产物克隆进行序列测定（同步骤1.3.2）。

表1 引物设计

Table 1 Oligonucleotide primers designed in the study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5′-3′)	用途 Use
H90F1	TGATC(T)GGTCAGTTC(T)GGTGTGG	HSP90部分序列的扩增 Amplification of partial HSP90 sequence
H90R1	A(G)TA(G)GGTCCTCACAGTTGTCCAT	
H90F2	A(G)TTCG(A)AGC(A or G)T(A or C)GTTTTCGTGC	
H90R2	TAG(A)G(A)A(G)AGCCAGA(T)GACAGC	
GSP1	CTGCT(A)CAGTAT(C)GGTTGGTCTGCC	3′RACE
GSP2	GGT(C)CTTCCTTGATGTG(C)GAGA(C)ACGAT	5′RACE
FQ	CTGGAACTAAGGCATTCATGGAGGC	HSP90实时PCR
RQ	CTGCTCGTCATTGTGCTTAG	HSP90 Real Time-PCR
Actin-S	TCCAGCCTTCCTTCTTGGGTAT	Actin实时PCR
Actin-A	CAGGTCCTTACGGATGTCAACG	HSP90 Real Time-PCR

5′RACE反应按照TaKaRa 5′-Full RACE Kit说明书进行。PCR反应参数为：94℃预变性3 min；然后94℃变性30 s，53℃退火30 s，72℃延伸1 min，共30个循环；最后72℃延伸10 min。扩增产物克隆进行序列测定（同步骤1.3.2）。

1.3.4 序列分析：将所得的HSP90核苷酸片段用DNAMAN软件进行连接，利用软件DNAstar和DNASIS软件找出开放阅读框并将核苷酸序列推导出氨基酸序列。利用Protparam软件分析推测该氨基酸序列基本的物理参数，并用PROSITE软件预测该氨基酸序列典型特征。根据SWISS-MODEL软件进行甜菜夜蛾HSP90氨基酸序列结构域预测。最后利用NCBI网上BLAST软件将推导的氨基酸序列和其他生物HSP90序列比对，进行同源性分析。

1.4 甜菜夜蛾HSP90基因表达的定量

1.4.1 总RNA提取和cDNA第一链的合成：按照Trizol说明书提取总RNA，用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测总RNA的纯度和浓度。选用A_{260}/A_{280}在1.90~2.0之间的总RNA样品500 ng，利用PrimeScript™ RT Reagent Kit (Perfect Real Time)反转录合成cDNA第一链。

1.4.2 引物的合成：根据克隆的甜菜夜蛾HSP90cDNA序列，利用Primer5.0软件设计引物，筛选出HSP90引物序列FQ，RQ（表1）。选择*β-actin*作为内参来校正定量结果，根据甜菜夜蛾*β-actin*的cDNA序列设计引物Actin-S和Actin-A（表1）。

1.4.3 标准曲线的制作：以cDNA为模板，用引物FQ和RQ进行普通PCR扩增（同步骤1.3.2）。扩增的PCR产物以1.2%的琼脂糖凝胶电泳进行检测和分离，用DNA纯化回收试剂盒纯化后扩增产物克隆进行序列测定（同步骤1.3.2）。利用紫外分光光度计测定质粒DNA的浓度，并稀释到8×10^{-2} ng/μL，然后倍比稀释直到8×10^{-7}ng/μL，共6个浓度。以上述6个浓度梯度的质粒为模板，进行荧光定量PCR扩增。根据浓度对数值和Ct值的关系（每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的PCR循环数）制作定量检测HSP90表达水平的标准曲线。将6个浓度的质粒DNA置于-70℃作为标准品备用。荧光定

量 PCR 检测体系共 25 μL：SYBR Premix Ex Taq(2×) 12.5 μL，Fluorescein calibration dye (100 nmol) 2.5 μL，sense primer (FQ) 0.5 μL，antisense primer (RQ) 0.5 μL，质粒 DNA 1 μL，ddH_2O 8 μL。荧光定量 PCR 循环条件：95℃预变性 10 s；然后 95℃变性 5 s，60℃退火与延伸 30 s，共 40 个循环；95℃，1 min；60℃，10 s；55℃，10 s，每个循环增加 0.5℃，78 个循环。以 Actin-S，Actin-A 为引物，用上述同样的方法制作定量检测 *β-actin* 表达水平的标准曲线。

1.4.4　幼虫体内 HSP90 基因表达量的检测：将 2，3，4 和 5 龄甜菜夜蛾幼虫分别在 37，39，41，43，45℃的水浴中温浴 1 h，取出 26℃恢复 1 h，之后迅速置于液氮中冷冻致死。每个龄期处理均以 26℃下饲养的相同龄期的幼虫作为对照。按 1.4.1 步骤提取总 RNA，反转录 cDNA 后为模板进行荧光定量 PCR 扩增检测，一次荧光 PCR 扩增检测一个龄期不同温度处理及对照试虫体内的 HSP90 基因的表达量。同时将 6 个浓度梯度的 HSP90 标准品进行荧光 PCR 扩增，绘制出标准曲线。通过标准曲线读出试虫体内 HSP90 基因表达量。同样的方法绘制 *β-actin* 的标准曲线，从标准曲线上读出不同温度处理及对照组 *β-actin* 的定量结果。*β-actin* 作为看家基因，在不同条件下的表达量应该是相同的，因此不同温度处理试虫体内 *β-actin* 的定量结果和对照组定量结果相比进行自身的校正，得出 *β-actin* 的校正值。HSP90 基因相对表达量计算公式如下：

$$\beta\text{-}actin\ 校正值(X) = \frac{\beta\text{-}actin\ 处理组定量结果}{\beta\text{-}actin\ 对照组定量结果}$$

$$hsp90\ 校正值(Y) = \frac{hsp90\ 定量结果}{X}$$

$$hsp90\ 相对值 = \frac{Y}{hsp90\ 对照组校正值}$$

1.4.5　数据处理：标准样品的荧光定量 PCR 扩增曲线由 PCR 仪自动生成。标准品质粒浓度和 Ct 值之间的线性关系分析及不同温度处理的样品中 HSP90 基因相对表达量的显著性差异分析用统计软件 SPSS 进行(SPSS. v16.0)，显著性检测水平均为 $P \leqslant 0.05$。

2　结果与分析

2.1　甜菜夜蛾 HSP90 基因全长 cDNA 序列的克隆

利用简并引物(H90F1 和 H90R1)进行 PCR 扩增 HSP90 基因目的片段，扩增产物琼脂糖电泳检测时只有一条带(图 1：A)，其长度为 741 bp。根据已得序列继续设计简并引物 H90F2 和 H90R2，接着进行 HSP90 基因的扩增与克隆，其产物进行琼脂糖电泳检测，发现只有一条带(图 1：B)，长度为 1 024 bp。测序结果通过 NCBI-BLAST 比对分析表明，和其他生物的 HSP90 序列有很高的同源性。进而通过 RACE-PCR 技术分别获得 415 bp 的 3′端序列(图 2：A)和 698 bp 的 5′端序列(图 2：B)。最后利用 DNAMAN 软件将 4 段相互重叠的片段进行拼接，获得了 2 453 bp 的 HSP90 基因 cDNA 序列(图 3，GenBank 登录号为：FJ862050)。开放阅读框长 2 154 bp，合成 717 个氨基酸。

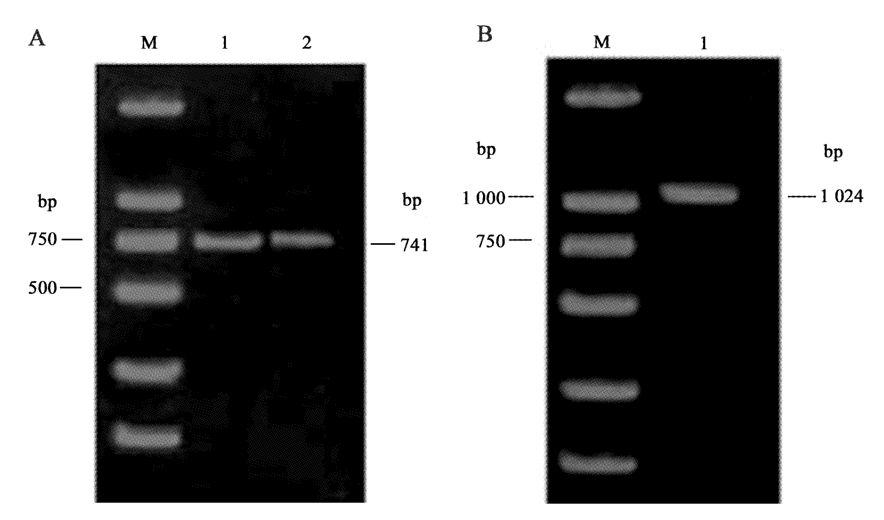


图 1　甜菜夜蛾 HSP90 基因 RT-PCR 产物鉴定

Fig. 1　RT-PCR products of *Spodoptera exigua* HSP90 gene

A，B：分别代表不同引物扩增的 RT-PCR 产物 Different RT-PCR products amplified with different degenerate primers, respectively. M：DNA 分子量标准 DNA marker DL2000；1，2：RT-PCR 产物 RT-PCR products.

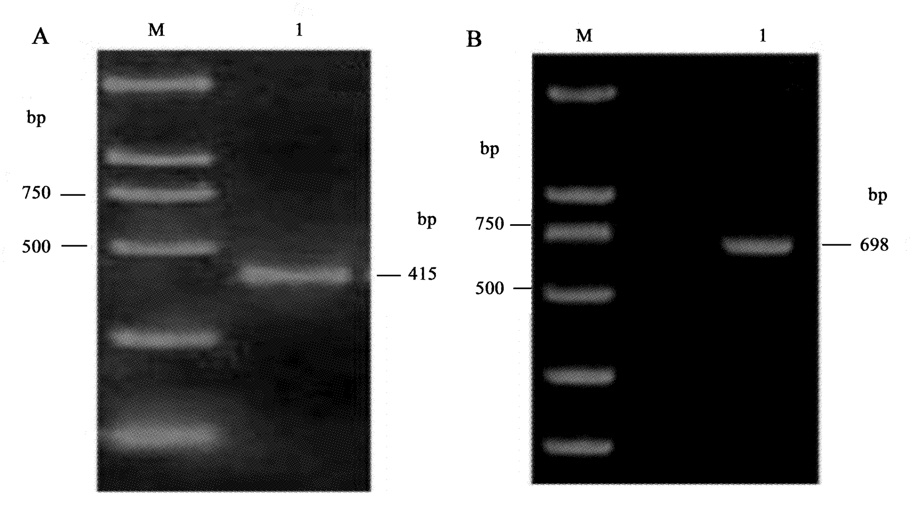


图 2 甜菜夜蛾 HSP90 基因 3′(A)和 5′端(B)RT-PCR 产物鉴定

Fig. 2 RT-PCR products of *Spodoptera exigua* HSP90 3′RACE (A) and 5′RACE (B)

M: DNA 分子量标准 DNA marker DL2000; 1: RT-PCR 产物 RT-PCR products.

2.2 序列分析

将推导的氨基酸由 Protparam 软件分析推测:该蛋白的相对分子量是 82.6 kD,分子式为 $C_{3645}H_{5799}N_{969}O_{1163}S_{26}$,等电点为 5.0。利用 DNASIS 软件将得到的 HSP90 核苷酸序列推导出氨基酸序列(图 3)。使用 PROSITE 软件分析发现,推导的氨基酸序列含有 HSP90 家族的 1 段签名序列:YSNKEIFLRE(第 33 ~ 42 位氨基酸)(图 3)。SWISS-MODEL 软件分析表明第 191 ~717 位氨基酸为 HSP90 家族序列,第 33 ~188 位氨基酸是 ATP 结合位点,具有类 ATPase 活性;第 15 ~290 位氨基酸是分子伴侣、DNA 拓扑异构酶Ⅱ、组氨酸蛋白激酶 ATPase 结构域;第 278 ~533 位氨基酸残基是 2 个类核糖体蛋白 S5 结构域;第 556 ~678 位氨基酸残基属于 HSP90 的 C 末端底物结合区(图 3)。HSP90 C-端最末端 4 个氨基酸是 EEVD(Glu-Glu-Val-Asp),这是所有真核细胞 HSP90 的共同特征。通过 blast 进行序列比对,结果发现,所得甜菜夜蛾 HSP90 cDNA 序列和草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (AF254880)、甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* (GenBank: AB251894)HSP90 cDNA 序列同源性分别达到 99% 和 98%;与美洲斑潜蝇 *Liriomyza sativae* (GenBank: AY851368) 和黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (GenBank: NM_079175)的同源性为 84% 和 83%;与人 *Homo sapiens* (GenBank: NM_005348)、褐家鼠 *Rattus norvegicus* (GenBank: NM_175761)HSP90 序列的同源性分别是 81% 和 80%。

2.3 甜菜夜蛾 HSP90 基因在高温胁迫下的相对表达

用特异性引物 FQ,RQ 和 Actin-S,Actin-A 分别进行普通 PCR 扩增 HSP90 和 *β-actin* 目的基因。测序鉴定结果表明扩增的 HSP90 和 *β-actin* 基因目的片段分别长 145 bp 和 96 bp,并与甜菜夜蛾 HSP90 和 β-actin 基因相对的 cDNA 序列有 100% 的同源性,说明构建的重组质粒中含有目的片段。倍比稀释的提纯的质粒 DNA 实时荧光 PCR 结果显示,浓度每降低 10 倍,Ct 值就会相应增加 3 ~4 个循环。模板浓度与可检测到荧光信号的循环数呈显著的线性关系,其相关系数 R 分别为 0.997 和 0.998,直线斜率在 −2.5 ~3.4 之间,PCR 扩增效率为 98.8% 和 99.5%,表明 HSP90 的标准曲线可以在较宽的范围内用于甜菜夜蛾 HSP90 相对表达量检测。

高温胁迫对甜菜夜蛾幼虫体内的 HSP90 基因表达具有明显的诱导作用。幼虫从低龄(2 龄)到高龄(5 龄)不同发育阶段,均表现出随着胁迫温度的升高,体内 HSP90 基因的表达量呈增加趋势。其中,在 37℃ 和 39℃ 热激 1 h,不同龄期的幼虫体内 HSP90 基因的表达量均与对照组无显著差异($P > 0.05$),当胁迫温度提高到 41℃ 时,不同龄期的幼虫体内 HSP90 基因的表达量均有较大程度的增加,其中 1 龄和 4 龄幼虫体内 HSP90 基因表达量显著高于对照($P < 0.05$)。随着胁迫温度继续上升(43℃ 和 45℃),所有龄期(5 龄除外)的幼虫体内 HSP90 基因表达量均显著高于对照($P < 0.05$,图 4)。这表明,高温能显著诱导甜菜夜蛾幼虫体内 HSP90 基因表达量的增加。

```
            CATTTAATTCAAGAAAGCAAAGTGAGAGATACGCTGCGATTCCACGC GAT CTTACAACACGTGTATTAAAACC
      GCGCTAGTCAAGAGATTTTAGCAAGTGTTCTGTGCTTACTGTATTCGTTACTTCGAAGAATTT TAAATTAAATTAAGTGAATCAGTCAAA
1     ATGCCCGAAGAAATGCAGACCGATGTTGCCGAGGTGGAGACCTTCGCCTTCCAGGCGGAGATC GCCCAGCTTATGTCCCTGATCATCAAC
1      M  P  E  E  M  Q  T  D  V  A  E  V  E  T  F  A  F  Q  A  E  I  A  Q  L  M  S  L  I  I  N
91    ACATTCTACTCCAACAAAGAGATCTTCCTTCGTGAGTTAATCTCCAACTCTTCAGACGCCTTG GACAAGATCCGTTATGAGTCACTCACC
31     T  F  Y  S  N  K  E  I  F  L  R  E  L  I  S  N  S  S  D  A  L  D  K  I  R  Y  E  S  L  T
181   GACCCATCGAAGCTGGACAGCGGCAAGGACCTGTACATCAAGATCATTCCCAACAAGAGCGAA GGTACACTCACTATTATTGATACCGGT
61     D  P  S  K  L  D  S  G  K  D  L  Y  I  K  I  I  P  N  K  S  E  G  T  L  T  I  I  D  T  G
271   ATTGGTATGACCAAGGCTGACCTCGTCAACAACCTTGGTACCATCGCCAAGTCTGGAACTAAG GCATTCATGGAGGCCCTGCAGGCAGGC
91     I  G  M  T  K  A  D  L  V  N  N  L  G  T  I  A  K  S  G  T  K  A  F  M  E  A  L  Q  A  G
361   GCTGACATTAGCATGATTGGTCAGTTCGG TGTGGGTTTCTACTCATGCTATCTGGTCGCTGACCGCGTGACTGTTCACTCTAAGCACAAT
                H90F1
121    A  D  I  S  M  I  G  Q  F  G  V  G  F  Y  S  C  Y  L  V  A  D  R  V  T  V  H  S  K  H  N
451   GACGACGAGCAGTACCGGTGGGAGTCGTCGGCGGGAGGCTCGTTCACAGTCCGCCCTGACCAT GACGAGCCCCTCGGACGCGGTACAAAG
151    D  D  E  Q  Y  R  W  E  S  S  A  G  G  S  F  T  V  R  P  D  H  D  E  P  L  G  R  G  T  K
541   ATCGTTCTCCACATCAAGGAAGACCTCACTGAGTACCTTGAAGAGCACAAGATTAAGGAAATC GTCAAGAAGCACTCGCAGTTCATCGGC
         GSP2
181    I  V  L  H  I  K  E  D  L  T  E  Y  L  E  E  H  K  I  K  E  I  V  K  K  H  S  Q  F  I  G
631   CCCATCAAACTGATGTACGTTGAGAAGGAACGTGAGAAGGAGCTCTCTGATGATGAGGCCGAG GAGGAGAAGAAAGAGGATGAAAAGGAG
211    Y  P  I  K  L  M  V  E  K  E  R  E  K  E  L  S  D  D  E  A  E  E  E  K  K  E  D  E  K  E
721   GATGACAAGCCTAAGATTGAGGATGTGGGAGAGGATGACGAAGAGGACAAGAAAGATAAGAAG AAGAAGAAGACCATCAAGGAGAAATAC
241    D  D  K  P  K  I  E  D  V  G  E  D  D  E  E  D  K  K  D  K  K  K  K  K  T  I  K  E  K  Y
811   ACAGAGGACGAGGAACTCAACAAGACCAAGCCCATCTGGACCCGTAACGCCGACGATATCACA CAGGAGGAGTATGGTGACTTCTACAAA
271    T  E  D  E  E  L  N  K  T  K  P  I  W  T  R  N  A  D  D  I  T  Q  E  E  Y  G  D  F  Y  K
901   TCCCTCACCAATGACTGGGAGGACCACCTTGCTGTCAAACACTTCTCAGTTGAAGGTCAGTTG GAGTTCAGAGCCTTGTTGTTCGTGCCC
                                                                             H90F2
301    S  L  T  N  D  W  E  D  H  L  A  V  K  H  F  S  V  E  G  Q  L  E  F  R  A  L  L  F  V  P
991   CGCCGTGCTCCCTTCGACTTGTTTGAGAACAAGAAGCGCAAGAACAACATCAAACTGTACGTC CGCAGAGTATTCATCATGGACAACTGT
331    R  R  A  P  F  D  L  F  E  N  K  K  R  K  N  N  I  K  L  Y  V  R  R  V  F  I  M  D  N  C
1 081 GAGGACCTTATTCCTGAATACCTGAACTTTATCAAGGGTGTTGTAGACAGTGAGGACCTGCCC CTCAACATCTCTCGTGAGATGCTTCAA
      H90R1
361    E  D  L  I  P  E  Y  L  N  F  I  K  G  V  V  D  S  E  D  L  P  L  N  I  S  R  E  M  L  Q
1 171 CAGAACAAGATCCTTAAAGTAATCAGAAAGAACTTGGTTAAGAAATGCTTGGAACTCTTCGAA GAGTTGGCTGAAGACAAAGAGAACTAC
391    Q  N  K  I  L  K  V  I  R  K  N  L  V  K  K  C  L  E  L  F  E  E  L  A  E  D  K  E  N  Y
1 261 AAGAAGTATTACGAACAGTTCAGCAAGAACCTGAAGCTTGGTATCCATGAGGACTCTCAGAAC AGGTCAAAACTGGCTGACTTGCTCCGC
421    K  K  Y  Y  E  Q  F  S  K  N  L  K  L  G  I  H  E  D  S  Q  N  R  S  K  L  A  D  L  L  R
1 351 TACCACACATCTGCCTCTGGTGATGAGGCATGCTCCCTTAAAGAGTATGTCTCACGTATGAAG GAGAACCAGAAACACATCTACTACATC
451    Y  H  T  S  A  S  G  D  E  A  C  S  L  K  E  Y  V  S  R  M  K  E  N  Q  K  H  I  Y  Y  I
1 441 ACTGGTGAGAACCGTGACCAGGTTGCCAACTCATCATTTGTAGAGCGAGTCAAGAAGCGTGGT TATGAAGTTGTATACATGACTGAGCCT
481    T  G  E  N  R  D  Q  V  A  N  S  S  F  V  E  R  V  K  K  R  G  Y  E  V  V  Y  M  T  E  P
1 531 ATTGATGAGTATGTAGTACAGCAGATGAAAGAGTATGATGGTAAGACTCTTGTCTCT GTCACAAAGGAGGGTCTGGAACTCCCTGAAGAT
511    I  D  E  Y  V  V  Q  Q  M  K  E  Y  D  G  K  T  L  V  S  V  T  K  E  G  L  E  L  P  E  D
1 621 GAAGAAGAAAAGAAGAAGCGTGAGGAGGACAAGGTGAAGTTCGAGGGTCTCTGCAAGGTCATG AAGAACATCCTTGACAACAAAGTCGAG
541    E  E  E  K  K  K  R  E  E  D  K  V  K  F  E  G  L  C  K  V  M  K  N  I  L  D  N  K  V  E
1 711 AAGGTTGTTGTATCTAACCGTCTTGTTGAGTCGCCATGCTGCATTGTCACTGCTCAGTATGGT TGGTCTGCCAACATGGAACGTATCATG
                                                             GSP1
571    K  V  V  V  S  N  R  L  V  E  S  P  C  C  I  V  T  A  Q  Y  G  W  S  A  N  M  E  R  I  M
1 801 AAGGCCCAGGCTCTCCGTGACACTGCCACCATGGGTTACATGGCAGCCAAGAAACACCTTGAA ATTAACCCTGACCATTCCATTGTTGAG
601    K  A  Q  A  L  R  D  T  A  T  M  G  Y  M  A  A  K  K  H  L  E  I  N  P  D  H  S  I  V  E
1 891 ACCCTGAGGCAGAAGGCAGAGGCTGACAAGAACGACAAGGCTGTCAAGGACCTCGTCATCCTT TTGTACGAGACTGCCCTGCTGTCTTCT
631    T  L  R  Q  K  A  E  A  D  K  N  D  K  A  V  K  D  L  V  I  L  L  Y  E  T  A  L  L  S  S
1 981 GGCTTCACCCTAGACGAGCCCCAAGTGCACGCCTCTCGCATCTACCGCATGATCAAGCTTGGT CTTGGCATCGACGAGGACGAGCCCATC
      H90R2
661    G  F  T  L  D  E  P  Q  V  H  A  S  R  I  Y  R  M  I  K  L  G  L  G  I  D  E  D  E  P  I
2 071 CAGGTTGAGGAGTCGAGCGCCGGCGACGTGCCCCCGCTAGAGGGCGACGCTGACGACGCGTCA CGTATGGAGGAAGTGGATTAA 3'
691    Q  V  E  E  S  S  A  G  D  V  P  P  L  E  G  D  A  D  D  A  S  R  M  E  E  V  D  *
      AATCTCAGCTTTTAGCCATGTTGTAATGGTGTTTATGTGATTGTATCGCGAAGTTATTTTGTG CACTGGTGTACAGCCAAAGACTGATTT
      AGTTCAAATTCCATTATTCAAAATAAATGGTACCTTAACAAACCA A
```

图 3　甜菜夜蛾 HSP90 基因核苷酸序列和氨基酸序列比较

Fig. 3　Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Spodoptera exigua* HSP90 cDNA

*代表终止密码子，箭头表示引物位置，粗体并下划线为 HSP90 家族签名序列。The asterisk marks the termination codon. Signature sequence is indicated by bold and underlined, and the arrows indicate the primers used in PCR amplification.

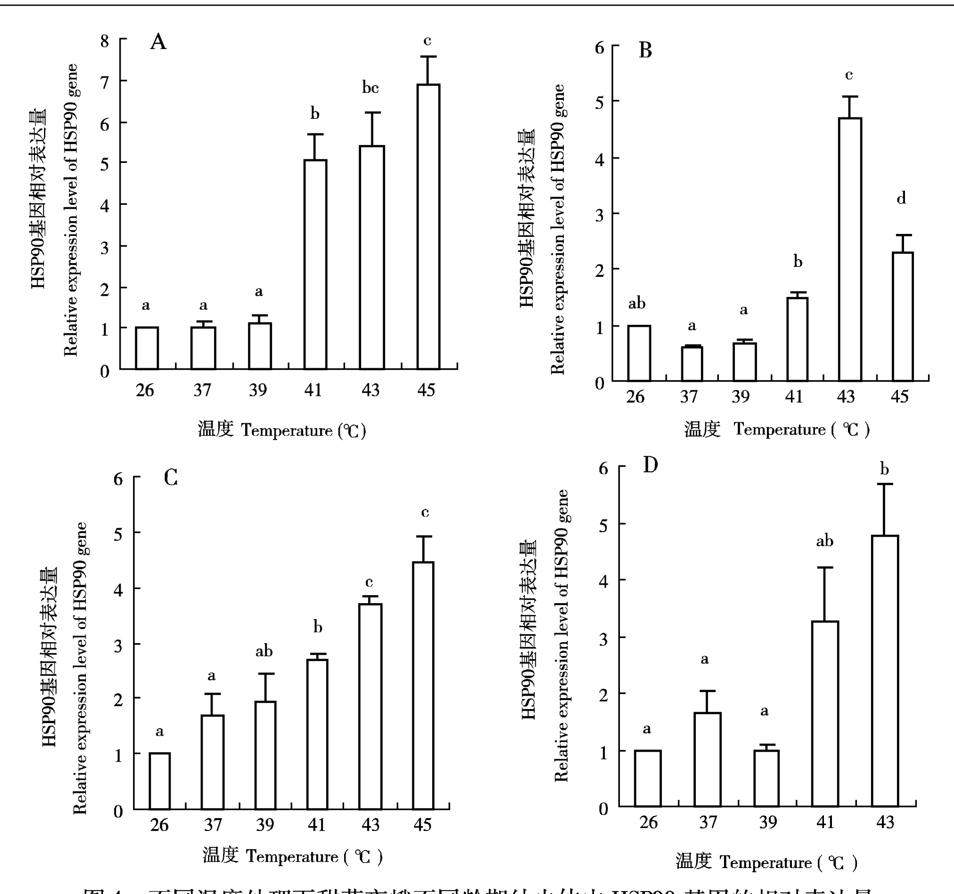


图 4 不同温度处理下甜菜夜蛾不同龄期幼虫体内 HSP90 基因的相对表达量

Fig. 4 The relative expression levels of HSP90 gene at different instars of *Spodoptera exigua* larvae after exposure to different high temperatures

A, B, C, D: 分别代表 2, 3, 4, 5 龄幼虫 HSP90 基因的表达量 Relative expression levels of HSP90 gene in 2nd, 3rd, 4th and 5th instar larvae, respectively. 柱上不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著; 图 5 同。Different small letters above bars indicate significant difference at the 0.05 level; the same for Fig. 5.

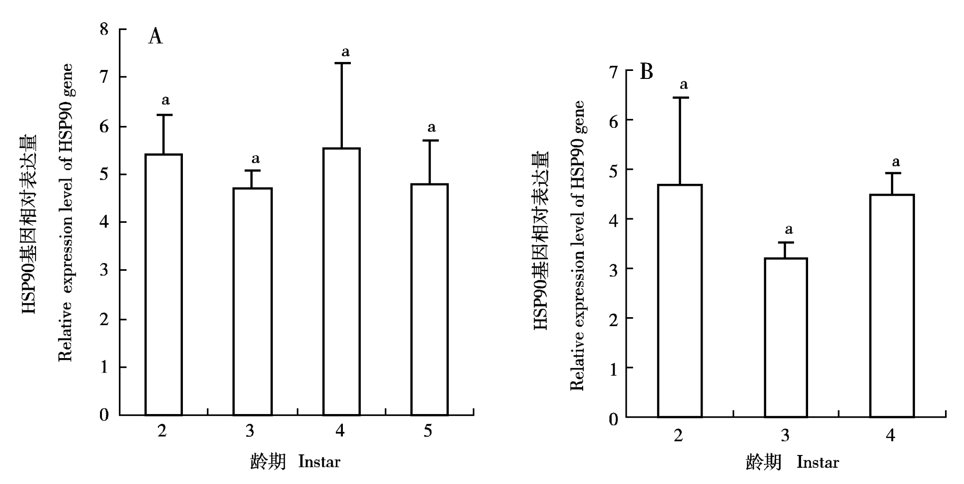


图 5 43℃(A)和 45℃(B)处理下甜菜夜蛾不同龄期幼虫体内 HSP90 基因的相对表达量

Fig. 5 Relative expression levels of HSP90 gene at different instars of *Spodoptera exigua* larvae after exposure to 43℃ (A) and 45℃ (B)

进一步将不同龄期的幼虫在 43℃ 和 45℃ 热激下体内 HSP90 基因的表达量进行了比较, 结果表明不同的龄期之间 HSP90 基因的表达量没有显著性差异($P > 0.05$),如图 5 所示。

3 讨论

HSP90 在包括昆虫在内的真核细胞中广泛存在, 通过 RT-PCR 结合 RACE 技术成功获得了甜菜

夜蛾2 453 bp 的 HSP90 基因全长 cDNA 序列。对其氨基酸序列分析表明，2 154 bp 的开放阅读框翻译717 个氨基酸，其中 N-端前25 个氨基酸是信号肽，随后的 692 个氨基酸残基是成熟的氨基酸序列。N-端是较保守的序列，有 ATP 结合位点，具有类似 ATPase 活性。ATP/ADP 结合部位承担着构象转换区的作用（Siligardi *et al.*，2002；McLaughlin *et al.*，2002）。甜菜夜蛾 HSP90 第 15 ~ 290 位氨基酸是分子伴侣、DNA 拓扑异构酶Ⅱ、组氨酸蛋白激酶 ATPase 结构域。DNA 拓扑异构酶Ⅱ是真核生物生存所必须的一种泛酶，在几乎所有 DNA 代谢中发挥重要作用。有研究表明 DNA 异构酶能够释放 DNA 链中积累的扭力，促使 DNA 舒展，从而使碱基储存的遗传信息准确地传递给子代（Koster *et al.*，2005）。甜菜夜蛾 HSP90 第 278 ~ 533 位氨基酸残基是 2 个类核糖体蛋白 S5 结构域，核糖体蛋白 S5 基因在蛋白质翻译忠实性和转位过程中有作用（Ramakrishnan and White，1992）。通过序列比对发现，甜菜夜蛾和其他多种生物的 HSP90 基因具有较高的同源性。HSP90 基因在从原核到真核细胞中普遍存在，并具有分子伴侣的作用，其基本的功能是结合并稳定变性的蛋白（Scheibel *et al.*，1998），因此在进化的过程中几乎没有什么变化。利用其进化的保守性，HSP90 基因可以作为研究物种间进化关系的一项重要参考指标。

HSP90 是真核细胞中最丰富的蛋白质之一，在正常情况下占胞质蛋白总量的 1% ~ 2%（Buchner，1996），在细胞受到胁迫时会成倍地增加（Nollen and Morimoto，2002；Whitesell and Lindquist，2005）。有实验表明，热应激的形成是多种分子伴侣参与并协助完成的。在 HSP90 的表达量增加几倍的时候，几乎只有 HSP90 单独维持着热敏蛋白结构的作用，因为其他类似蛋白的表达水平还处于较低的水平（Scheibel *et al.*，1998）。本实验在 37℃和 39℃处理 1 h 的诱导下，HSP90 基因的表达量和对照并没有显著地变化，可能是由于 HSP90 在正常状态下细胞中的含量就很丰富，在非极端的高温下，HSP90 较低的诱导量就足以对细胞起到保护作用。而在 41℃下热激 1 h 条件下，不同龄期的幼虫体内 HSP90 基因的表达量与对照相比存在显著差异和无显著差异，这可能和不同龄期的幼虫对高温的耐受性有关。Huang 等（2009）的研究也表明 HSP90 等大分子热激蛋白还可能在昆虫的生长发育中起着一定的作用。在高温（43℃和 45℃）胁迫下，不同发育阶段的幼虫体内 HSP90 基因的表达量与对照相比均有了显著地升高，这不仅表明 HSP90 在甜菜夜蛾抗高温中有明显的作用，同时也说明了甜菜夜蛾幼虫对高温具有很好的耐受性。尽管不同发育阶段的幼虫在 45℃下诱导的 HSP90 基因表达量比 43℃有所升高，但无显著差异，其中 3 龄幼虫在 45℃下 HSP90 基因的表达量还有所下降。这种在极端高温下 HSP90 降低或停止诱导表达，在很大程度上使幼虫失去了热激蛋白的保护能力，导致幼虫的死亡率增加。这与实验中两种高温胁迫下的幼虫死亡率结果一致：在 45℃热胁迫 1 h 各龄幼虫死亡率均显著高于 43℃，并且 5 龄幼虫经 45℃热激 1 h 死亡率为 100%。这也说明了 45℃热激对细胞产生的损害超出了诱导的 HSP90 和其他分子伴侣的保护能力。

甜菜夜蛾幼虫不同龄期在高温（43℃和 45℃）下诱导的 HSP90 基因表达量均无显著差异，这也与两种高温胁迫下不同龄期幼虫的死亡率（未发表数据）也无显著性差异的结果基本一致。43℃处理 2 龄幼虫的存活率最高（78% 左右），与其他龄期之间无有显著差异；45℃处理时 3 龄幼虫的存活率最高（50% 左右），也与 2 龄或 4 龄幼虫之间无显著差异。尽管仅仅根据 HSP90 的表达量和死亡率之间的关系还不能确定哪一个龄期的幼虫对高温最具有耐热性，可能还与不同的发育阶段幼虫体内的其他蛋白的作用有关系，但是能基本明确一定范围内高温能诱导甜菜夜蛾幼虫体内的 HSP90 表达量成倍地增加，从而对细胞能起到保护作用。HSP90 停止或降低诱导量时，可能即是昆虫忍受的极限温度，因此推测 45℃是甜菜夜蛾幼虫能忍受的极限高温。

甜菜夜蛾是一种重要的世界性农业害虫，具有较强的生态适应性，对高温、低温等不良环境均具有较强的耐受性。国内外许多学者分别从生理生态学方面阐明了温度、密度、营养、杀虫剂等环境因素对其生态适应性的影响（江幸福等，1999；江幸福和罗礼智，2001；王竑晟等，2004；林朱凤等，2007；王娟等，2008）。本实验成功克隆了甜菜夜蛾 HSP90 基因全长序列，并构建了荧光定量实时 PCR 体系，检测了不同高温下 HSP90 基因的表达水平，明确了随着高温的变化甜菜夜蛾幼虫不同发育阶段 HSP90 表达量的变化，阐明了 HSP90 基因的表达与其抗高温能力之间的关系。这为今后进一步研究甜菜夜蛾抗逆境的分子机制奠定基础，同时也为从分子水平揭示甜菜夜蛾生态适应性开拓思路。

参 考 文 献(References)

Buchner J, 1996. Supervising the fold: Functional principles of molecular chaperones. *FASEB Journal*, 10: 10 – 19.

Carper SW, Duffy JJ, Gerner EW, 1987. Heat shock proteins in thermotolerance and other cellular processes. *Cancer Research*, 47: 5 249 – 5 255.

Chen B, Kayukawa T, Monteiro A, Ishikawa Y, 2005. The expression of the *HSP90* gene in response to winter and summer diapauses and thermal-stress in the onion maggot, *Delia antiqua*. *Insect Molecular Biology*, 14: 697 – 702.

Feder ME, Hofmann GE, 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology*, 61: 243 – 282.

Gill KS, 1987. Insect pests of linseed. In: Linseed. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi, India. 342 – 355.

Huang LH, Wang CZ, Kang L, 2009. Cloning and expression of five heat shock protein genes in relation to cold hardening and development in the leafminer, *Liriomyza sativae*. *Journal of Insect Physiology*, 55: 279 – 285.

Jiang XF, Luo LZ, 1999. The reasons of *Spodoptera exigua* (Hb.) outbreak and control strategies. *Plant Protection*, 25(3): 32 – 34. [江幸福, 罗礼智, 1999. 甜菜夜蛾暴发原因及防治对策. 植物保护, 25(3): 32 – 34]

Jiang XF, Luo LZ, 2001. A study on the cold hardiness of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Acta Ecologica Sinica*, 21(10): 1 575 – 1 582. [江幸福, 罗礼智, 2001. 甜菜夜蛾抗寒与越冬能力研究. 生态学报, 21(10): 1 575 – 1 582]

Jiang XF, Luo LZ, Hu Y, 1999. Influence of larval diets on development, fecundity and flight capacity of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Acta Entomologica Sinica*, 42(3): 270 – 276. [江幸福, 罗礼智, 胡毅, 1999. 幼虫食物对甜菜夜蛾生长发育、繁殖及飞行的影响. 昆虫学报, 42(3): 270 – 276]

Jiang XF, Luo LZ, Li KB, Cao YZ, Hu Y, Liu YQ, 2002. Influence of temperature on flight capacity of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Acta Entomologica Sinica*, 45(2): 275 – 278. [江幸福, 罗礼智, 李克斌, 曹雅忠, 胡毅, 刘悦秋, 2002. 温度对甜菜夜蛾飞行能力的影响. 昆虫学报, 2002, 45(2): 275 – 278]

Koster DA, Croquette V, Dekker C, Shuman SS, Dekker NH, 2005. Friction and torque govern the relaxation of DNA supercoils by eukaryotic topoisomerase IB. *Nature*, 434: 671 – 674.

Kurdov M, 1986. Prognosis of massive multiplication of the small ground moth *Spodoptera exigua* Hbn. (*Laphygmia exigua* Hb.) in Turkmenia. *Izvestiya-Akademii-Nauk-Turkmenskoi-SSR* (*Biologicheskikh-Nauk*), 1: 25 – 28.

Lin ZF, Luo LZ, Pan XL, 2007. Insecticide abuse is an important cause of beet armyworm outbreak. *Entomological Knowledge*, 44(3): 327 – 332. [林朱凤, 罗礼智, 潘贤丽, 2007. 杀虫剂使用失当是甜菜夜蛾大发生的重要原因. 昆虫知识, 44(3): 327 – 332]

McLaughlin SH, Smith HW, Jackson SE, 2002. Stimulation of the weak ATPase activity of human HSP90 by a client protein. *Journal of Molecular Biology*, 315: 787 – 798.

Nollen EA, Morimoto RI, 2002. Chaperoning signaling pathways: Molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *Journal of Cell Science*, 115: 2 809 – 2 816.

Ramakrishnan V, White SW, 1992. The structure of ribosomal protein S5 reveals sites of interaction with 16S rRNA. *Nature*, 358: 768 – 771.

Rinehart JP, Denlinger DL, 2000. Heat-shock protein 90 is down-regulated during pupal diapause in the fleshfly, *Sarcophaga crassipalpis*, but remains responsive to thermal stress. *Insect Molecular Biology*, 9: 641 – 645.

Scheibel T, Weikl T, Buchner J, 1998. Two chaperone sites in Hsp90 differing in substrate specificity and ATP dependence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 95: 1 495 – 1 499.

Siligardi G, Panaretou B, Meyer P, Singh S, Woolfson DN, Piper PW, Pearl LH, Prodromou C, 2002. Regulation of HSP90 ATPase activity by the co-chaperone Cdc37p/p50cdc37. *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 20 151 – 20 159.

Sonoda S, Ashfaq M, Tsumuki H, 2006. Cloning and nucleotide sequencing of three heat shock protein genes (*hsp*90, *hsc*70, and *hsp*19.5) from the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) and their expression in relation to developmental stage and temperature, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 62: 80 – 90.

Sørensen JG, Kristensen TN, Loeschcke V, 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters*, 6: 1 025 – 1 037.

Wang HC, Xu HF, Cui F, Zhang HD, 2004. Effect of larval foods on fecundity and ovary development of beet armyworm *Spodoptera exigua* (Hübner). *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 13(2): 67 – 70. [王竑晟, 徐洪富, 崔峰, 张华德, 2004. 幼虫期营养对甜菜夜蛾生殖力及卵巢发育的影响. 西北农业学报 13(2): 67 – 70]

Wang HH, Lei ZR, 2005. Current developments of heat shock proteins in insect. *Scientia Agricultura Sinica*, 38(10): 2 023 – 2 034. [王海鸿, 雷忠仁, 2005. 昆虫热休克蛋白的研究进展. 中国农业科学, 38(10): 2 023 – 2 034]

Wang HS, Wang XH, Zhou CS, Huang LH, Zhang SF, Guo W, Kang L, 2007. cDNA cloning of heat shock proteins and their expression in the two phases of the migratory locust. *Insect Molecular Biology*, 16(2): 207 – 219.

Wang J, Jiang XF, Wu DL, Luo LZ, 2008. Effect of larval rearing density on development and fecundity of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 51(8): 889 – 894. [王娟, 江幸福, 吴德龙, 罗礼智, 2008. 幼虫密度对甜菜夜蛾生长发育与繁殖的影响. 昆虫学报, 51(8): 889 – 894]

Whitesell L, Lindquist SL, 2005. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 5: 761 – 772.

Xu GQ, An GR, 2000. The burst of *Laphygma exigua* in Liaoning Province. *Liaoning Agricultural Sciences*, (6): 53. [许国庆, 安桂荣, 2000. 甜菜夜蛾在辽宁爆发成灾. 辽宁农业科学, (6): 53]

Zhou CJ, Xu XQ, 1993. Studies on the biological characteristic of asparagus caterpillar and its control. *Sugar Crops of China*, (1): 24 – 27. [周传金, 徐学芹, 1993. 甜菜夜蛾生物学特性及防治研究. 中国糖料, (1): 24 – 27]

(责任编辑: 赵利辉)